

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



525157

(43) 国際公開日
2004 年 3 月 18 日 (18.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/021803 A1

- | | | |
|---|---|---|
| <p>(51) 国際特許分類:
A61K 7/00, 7/48, A23K 1/16</p> <p>(21) 国際出願番号:
PCT/JP2003/011311</p> <p>(22) 国際出願日:
2003 年 9 月 4 日 (04.09.2003)</p> <p>(25) 国際出願の言語:
日本語</p> <p>(26) 国際公開の言語:
日本語</p> <p>(30) 優先権データ:
特願2002-262163 2002 年 9 月 6 日 (06.09.2002) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 林原 健
(HAYASHIBARA, Ken) [JP/JP]; 〒700-0921 岡山県岡山市東古松4丁目9番8号 Okayama (JP).</p> <p>(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 渋谷 孝</p> | <p>A23L 1/076,</p> <p>PCT/JP2003/011311</p> <p>2003 年 9 月 4 日 (04.09.2003)</p> <p>日本語</p> <p>日本語</p> <p>2002 年 9 月 6 日 (06.09.2002) JP</p> <p>添付公開書類:
— 国際調査報告書</p> <p>2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。</p> | <p>(SHIBUYA, Takashi) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 福田 恵温 (FUKUDA, Shigeharu) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP). 三宅 俊雄 (MIYAKE, Toshio) [JP/JP]; 〒700-0907 岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内 Okayama (JP).</p> <p>(81) 指定国 (国内): BR, CN, JP, KR, US.</p> <p>(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).</p> |
|---|---|---|

(54) Title: REFINED ROYAL JELLY

(54) 発明の名称: 精製ローヤルゼリー

(57) Abstract: It is intended to provide refined royal jelly which has a lessened allergenicity but sustains the useful pharmacological effects inherent to royal jelly, a process for producing the same and use thereof. In the refined royal jelly as described above, the content of water-soluble proteins is lessened to 50% by weight or below based on the total protein content. The process for producing the same is characterized by comprising the step of adding water to royal jelly and centrifuging to thereby divide the mixture into a precipitate and a supernatant containing water-soluble proteins, the step of subjecting the obtained supernatant to ultrafiltration or gel filtration to thereby remove high-molecular weight substances containing the water-soluble proteins and collect low-molecular weight substances, and the step of mixing the low-molecular weight substances thus obtained with the precipitate as described above.

[続葉有]

WO 2004/021803 A1



(57) 要約:

アレルギー性が低減され、且つ、ローヤルゼリー本来の有用な薬理作用が保持された、精製ローヤルゼリーとその製造方法並びに用途を提供する。

その精製ローヤルゼリーは、水溶性蛋白含量が、全蛋白含量に対して50重量%未満に低減している精製ローヤルゼリーであり、その製造方法は、ローヤルゼリーに水を加えて遠心分離することにより沈殿と水溶性蛋白質を含む上清とに分離する工程、得られる上清を限外濾過又はゲル濾過することにより水溶性蛋白質を含む高分子物質を除去し低分子物質を採取する工程、及び得られた低分子物質を前記沈殿と混合する工程を組合わせることを特徴とする。

明 細 書

精製ローヤルゼリー

5 技術分野

本発明は、精製ローヤルゼリー、詳細には、水溶性蛋白質量が、全蛋白質量に対して50質量%未満に低減している精製ローヤルゼリーとその製造方法並びに用途に関するものである。

10 背景技術

ローヤルゼリーは、ミツバチの巣における王台（女王バチの房）に蓄積された、働きバチの外分泌腺からの乳白色の分泌物であり、女王バチとなるべき幼虫に餌として与えられるゼリー状物質である。その化学的組成は生産地や季節などにより、多少の差違はあるものの、水分65～75%（w/w）、蛋白質15～20%（w/w）、炭水化物10～15%（w/w）、脂肪1.7～6%（w/w）、灰分0.7～2%（w/w）とされており、10-ヒドロキシ-2-デセン酸をはじめとする有機酸類、各種ビタミン類、各種ミネラル類をも含んでいる。また、

20 ローヤルゼリーに含まれる蛋白質には水溶性のものと水不溶性のものがあり、前者が蛋白質全体の約75%を、後者が約25%をそれぞれ占めているとされている（例えば、竹中哲夫、ミツバチ科学、1982年、3巻、2号、69乃至74頁などを参照。）

25 ローヤルゼリーは古くからヒトの健康食品として広く利用されており、最近では、人体に対して有用な薬理作用、例えば抗

菌作用、免疫増強作用、抗腫瘍作用、抗炎症作用、寿命延長作用などを有するという報告が数多くなされている。

しかしながら、ローヤルゼリーにはアレルゲン性を示す物質が含まれているため、摂取することにより、個人差はあるもののアレルギー症状が引き起こされる場合があり、場合によっては重篤なアナフィラキシーショックを引き起こすこともある。このようなローヤルゼリーの問題点を解消する目的で、特開2002-112715号にはローヤルゼリーに糖分解酵素処理及び蛋白質分解酵素処理を施して低アレルゲン化する方法が開示されている。しかしながら、アレルゲン性を示す物質となる水溶性蛋白質を等電点沈殿により沈殿させ、糖分解酵素処理及び蛋白質分解酵素を用いて分解処理したこのローヤルゼリーは、添加した酵素自体が新たなアレルゲン性を示す物質となる可能性があり、健康を目的に摂取するローヤルゼリーとして好ましくないという問題点があった。

発明の開示

本発明は、斯かる状況に鑑み為されたものであり、アレルゲン性が低減され、且つ、ローヤルゼリー本来の有用な薬理作用が保持された、アレルギー症状を引き起す懸念の少ない精製ローヤルゼリーとその製造方法並びに精製ローヤルゼリーを配合してなる組成物の飲食物、飼料、餌料、ペットフード又は化粧品への用途を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記の課題を解決するため、アレルゲン性が低減され、且つ、ローヤルゼリー本来の有用な薬理作用が保持された、アレルギー症状を引き起す懸念の少ない高品質の精製

ローヤルゼリーとその製造方法について、鋭意研究を重ねてきた。その結果、未処理のローヤルゼリー（以下、本明細書では「未処理のローヤルゼリー」を単に「ローヤルゼリー」又は「生ローヤルゼリー」という場合がある。また、表中では「R J」と略記する場合がある。）を原料として、これに水を加えて遠心分離することにより上清と沈殿とに分離し、生ローヤルゼリーを対照として、それぞれのアレルギー性を測定したところ、生ローヤルゼリーに含まれるアレルギー性物質の大部分が上清に移行することを見出した。また、生ローヤルゼリーに水を加え、遠心分離して上清と沈殿に分離する工程（以下、本明細書ではこの工程を「水分画工程」と略称し、この操作を「水分画」と略称する。）と、該上清を限外濾過又はゲル濾過することにより水溶性蛋白質を含む高分子物質を除去し低分子物質を採取する工程（以下、本明細書では「高分子除去工程」と略称する。）、及び該限外濾過又はゲル濾過により得られる低分子物質を前記沈殿に合わせる工程（以下、本明細書では「混合工程」と略称する。）とを組合せる方法により、水溶性蛋白質が、全蛋白質量に対して50質量％（以下、本明細書では、特にことわらない限り、質量％を単に％と略称する。）未満に低減し、アレルギー性を低減し、且つ、生ローヤルゼリーが本来有する有用な薬理作用を保持した精製ローヤルゼリーを調製し得ることを独自の知見として見出した。

すなわち、本発明は、水溶性蛋白質量が、全蛋白質量に対して50％未満に低減している精製ローヤルゼリーとその製造方法並びに精製ローヤルゼリーを配合してなる組成物、更には該組成物の飲食物、飼料、餌料、ペットフード又は化粧品への用

途を提供することにより上記の課題を解決するものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、水溶性蛋白質量が、全蛋白質量に対して50%未満に低減している精製ローヤルゼリーに関するものである。本発明の精製ローヤルゼリーの原料として用いる生ローヤルゼリーは、分泌するハチの種類やその産地、及び供給形態（生または冷凍）に特に限定はない。分泌するハチの種としては、セイヨウミツバチ（*Apis mellifera*）、トウヨウミツバチ（*Apis cerana*）、オオミツバチ（*Apis dorsata*）、コミツバチ（*Apis florea*）などが挙げられる。産地としては、日本、南米、北米、豪州、中国、欧州などが挙げられる。これらのローヤルゼリーはいずれも本発明の精製ローヤルゼリーの原料として有利に用いることができるものの、できるだけ新鮮な、又は、低温保存された生ローヤルゼリーを用いるのがより望ましい。

本発明の精製ローヤルゼリーは、ローヤルゼリーが本来有する有用な薬理作用を実質的に失わない範囲で、水溶性蛋白質量が、全蛋白質量に対して50%未満、より好ましくは40%未満、更に好ましくは20%未満、より更に好ましくは10%未満に低減しており、且つ、それによってアレルギー性が低減したものであれば良い。本発明における蛋白質の定量は、斯界で汎用される蛋白質の定量方法であるローリー（Lowry）の方法（O. H. Lowry等、ジャーナル・バイオロジカル・ケミストリー（*Journal Biological Chemistry*）、第193巻、265頁、1951年）により、

ウシ血清アルブミンを標準蛋白質として用いて行う。また、ローヤルゼリーに含まれるアレルゲン性は、後記実験例で示す測定法により確認することができる。

5 本発明の精製ローヤルゼリーは、ローヤルゼリー本来の有用な薬理作用に寄与している10-ヒドロキシ-2-デセン酸をよく保持している一方、アレルゲン性の原因となる高分子物質である蛋白質を低減させているものであり、その理化学的指標としては、遊離脂肪酸換算での10-ヒドロキシ-2-デセン酸に対する全蛋白質の質量比が挙げられ、本発明の精製ローヤ
10 ルゼリーはこの比が6未満である。この質量比は生ローヤルゼリーの場合、通常、7乃至15の範囲にあって、本発明の精製ローヤルゼリーのそれと明瞭に区別することができる。なお、10-ヒドロキシ-2-デセン酸は、後記実験例で示す測定法により定量することができる。

15 また、本発明の精製ローヤルゼリーは、これに含まれる蛋白質を8M尿素存在下、pH3乃至10の範囲でゲル等電点電気泳動にかけ、等電点5未満を示す蛋白質と等電点5以上を示す蛋白質の量比を後記する実験例に従って測定することによっても特定することができる。本発明の精製ローヤルゼリーは、等
20 電点5未満を示す蛋白質に対する等電点5以上を示す蛋白質の量比が1以上を示し、1未満を示す生ローヤルゼリーと明瞭に区別することができる。

ローヤルゼリーの精製方法は、ローヤルゼリーが本来有する有用な薬理作用を実質的に失うことなく、アレルゲン性を除去
25 できる方法であればよく、具体的には、水溶性蛋白質量を、全蛋白質量に対して50%未満、より好ましくは40%未満、更

に好ましくは 20% 未満、より更に好ましくは 10% 未満にまで低減できるものであればよい。具体的な精製方法としては、例えば、水希釈、遠心分離、膜濾過、濾過、濃縮、分別沈澱、塩析、透析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、等電点クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲル電気泳動、等電点電気泳動など蛋白質含有物質を精製するために斯界で汎用される方法の 1 又は複数を適宜用いることができる。

- 10 本発明の精製ローヤルゼリーの製造方法は、水分画工程と高分子除去工程、及び混合工程との組合せからなり、上記方法の内、水希釈及び遠心分離は水分画工程で用いられる。高分子除去工程では膜分離、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの方法が有用であるものの、膜分離の方がより簡便に行えるため好適である。

15 本発明において水溶性蛋白質は、水分画工程において生ローヤルゼリーに水を加え、遠心分離した場合に上清に移行し水不溶性の沈殿と分離することができる。本発明でいう全蛋白質量とは数式 1 にて算出されるように、上清の蛋白質量（水溶性蛋白質量）と沈殿の蛋白質量とを合計したものを意味する。また、本発明でいう全蛋白質量に対する水溶性蛋白質量の割合（%）とは数式 2 で算出されるように、全蛋白質量に占める水溶性蛋白質量の割合を意味する。

25 数式 1

全蛋白質量＝上清の蛋白質量(水溶性蛋白質量)＋沈殿の蛋白質量

数式 2

全蛋白質量に対する水溶性蛋白質量の割合(%)＝(水溶性蛋白質量／全蛋白質量)×100

5

以下、本発明のローヤルゼリーの精製方法について、工程別に説明する。

(水分画工程)

前記したように、本発明者らはローヤルゼリーに含まれるアレルギー性が主として水分画の上清に存在する高分子物質に由来していることを見出した。本工程はローヤルゼリーを水分画することにより、上清と沈殿とに分離する工程である。ローヤルゼリーに加える水としては特に限定されず、必要に応じて、例えば、超純水、イオン交換水、蒸留水、磁化水、ミネラルウォーター、水道水、海洋深層水のいずれも有利に利用できる。

10 ローヤルゼリーを懸濁、溶解した水溶液のpHを一定範囲に保つために必要に応じて緩衝液を用いることもできる。ローヤルゼリーを懸濁、溶解した水溶液のpHは、通常、pH 3.5乃至4.5の範囲にあるため特にpH調整する必要はない。しかしながら、pHが3.5未満の場合、酸味が強くなり、食品としての加工上に不都合となる。また、pHが4.5より高くなると本来水溶性である蛋白質が等電点沈殿を起こし沈殿となる場合があるため、水分画に適さない。ローヤルゼリーを懸濁、溶解した水溶液のpHは3.5乃至4.5の範囲に保つのが望

15

20

ましい。また、精製中、ローヤルゼリーに含まれる有効成分を安定に保つためには比較的低温で無菌の水を用いるのが望ましい。ローヤルゼリーに加える水の量は、水分画を繰り返す回数によっても異なるものの、通常、生ローヤルゼリー質量の1乃至1000倍量が用いられ、好ましくは1乃至100倍量が用いられる。混合する水の量が少なすぎると水溶性蛋白質の溶解が不十分となり上清と沈殿の分離も不十分なものとなる。また、加える水が多すぎると製造に時間を要することになり、有効成分の劣化をまねくことにもつながる上に、作業効率の面からも好ましくない。水分画は比較的少量の水を用いて遠心分離を一回で行っても、又は、比較的少量の水を用いて数回に分けて行ってもよい。本発明の、水溶性蛋白質質量の全蛋白質質量に対する割合を50%未満にまで低減する目的のためには、生ローヤルゼリー質量の4倍量程度の水を加える場合には、水分画を少なくとも1回行うか、好ましくは2回以上繰り返すのが望ましい。遠心分離は上清と沈殿とに充分分離できるものであればよく、バッチ式、連続式のいずれの方式も有利に用いることができる。遠心分離の条件は、用いる遠心力や遠心分離の時間によっても左右されるものの、通常、 $3,000 \times g$ の遠心力で10分以上、好ましくは $5,000 \times g$ で10分以上、更に好ましくは $10,000 \times g$ で10分以上行うのが望ましい。

(高分子除去工程)

上記、水分画工程により得られるアレルギー性を示す上清には高分子物質である水溶性蛋白質が含まれる一方、本来ローヤルゼリーに含まれる有用な10-ヒドロキシー-2-デセン酸などの有機酸、アミノ酸、糖質、ビタミン類などの低分子物質も

同時に含まれる。本工程は上清に存在する物質を限外濾過又はゲル濾過により高分子物質と低分子物質とに分離し、水溶性蛋白質を含む高分子物質を除去し、有用な低分子物質を採取する工程である。高分子物質である水溶性蛋白質は、これが通過できないポアサイズの限外濾過膜を使用した膜分離により効果的に除去することができる。この様な限外濾過膜としては、例えば、分画分子量 1, 0 0 0 乃至 1 0, 0 0 0 ダルトンから選ばれる限外濾過膜が好ましい。分画分子量 1, 0 0 0 ダルトン未満では低分子物質までが除去される懸念があり、1 0, 0 0 0 ダルトンより大きい膜では濾液に高分子物質である水溶性蛋白質の一部が混入する懸念がある。ゲル濾過クロマトグラフィーなどによっても低分子物質と高分子物質を分離することは可能であり、この様な方法を本発明の高分子除去工程に用いても良いものの、作業の効率や産業上の応用性を考慮すると限外濾過膜を用いるのが好ましい。

(混合工程)

本工程は高分子除去工程で採取した有用な低分子物質を前記沈殿と混合して本発明の精製ローヤルゼリーとする工程である。限外濾過又はゲル濾過によって得られた低分子物質を直接、前記沈殿と混合してもよい。通常、限外濾過又はゲル濾過により得られる低分子物質は原料中の本来の濃度よりもかなり希釈される場合が多く、そのような場合には、必要に応じて該低分子物質を濃縮した後、沈殿と混合することもできる。また、低分子物質と前記沈殿とを混合した後、濃縮することも随意である。濃縮は必要に応じて加熱濃縮、減圧濃縮、逆浸透膜濃縮が採用される。これらの中では比較的低温で行える減圧濃縮、逆浸透

膜濃縮がローヤルゼリーに含まれる有効成分の熱変性などの懸念が少なく好ましい。逆浸透膜にて濃縮する場合は、ローヤルゼリーに含まれる水溶性低分子物質を濃縮液側に回収できる膜であればよく、通常、食塩カット率が75%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の逆浸透膜が用いられる。この操作により濃度を適宜調製すれば、所望の濃度の本発明の精製ローヤルゼリーを得ることができる。

以上の方法で得られる本発明の精製ローヤルゼリーは、全蛋白質量に対する水溶性蛋白質量の割合が50%未満にまで低減されており、それに伴いローヤルゼリーに含まれるアレルギー性物質の量も低減されて、且つ、ローヤルゼリーが本来有する、抗炎症作用及び寿命延長作用等の有用な薬理作用を実質的に失っていないので、健康の維持、増進を目的とした健康食品などとして有利に利用できる。

本発明の精製ローヤルゼリーは、上記で述べたようにそれ自体で有用である一方、他の成分に配合してなる組成物の形態としても有利に利用できる。本発明は斯かる組成物を提供するものでもある。本発明による組成物は、通常、ヒトを含む哺乳類への経口的又は経皮的適用ないしは皮膚外用が許容される成分の1種又は2種以上を当該精製ローヤルゼリーとともに含んでなり、例えば、食品分野、飲料分野、飼料・餌料・ペットフード分野、化粧品分野などで有利に利用することができる。本発明で用いる、ヒトを含む哺乳類への経口的又は経皮的適用ないしは皮膚外用が許容される成分としては、本発明の組成物の個々の利用分野で通常使用される、例えば、水、アルコール、澱粉質、蛋白質、アミノ酸、繊維質、糖質、脂質、脂肪酸、ビ

タミン、ミネラル、着香料、着色料、甘味料、調味料、香辛料、防腐剤、乳化剤、界面活性剤などが挙げられる。以上のような成分を含む本発明の組成物の形態には特に制限はなく、粉末、顆粒、錠剤、ペースト、乳液、溶液などの所望の形態で提供される。

本発明の精製ローヤルゼリーを配合してなる組成物を製造するには、以上に示したような成分と個々の含量に基づいて、目的に応じて、すなわち、対象とする哺乳類の種類やその摂取方法などに応じて選ばれる適宜の組成に従って混合し、希釈、濃縮、乾燥、濾過、遠心分離等の処理を適宜施し、必要に応じて所望の形状に成形すればよい。各成分を配合する順序や、種々の処理を施す時期は、精製ローヤルゼリーの品質劣化をもたらさないものであればいずれでもよく、例えば、できるだけ調製直後の、又は、調製後低温保存された精製ローヤルゼリーを混合し、その後、必要に応じて種々の処理を適宜施せばよい。また、製造過程での精製ローヤルゼリーの品質の劣化を防ぐためには、上記の工程はいずれも常温以下、望ましくは、30℃以下の条件下で行うのがよい。

本発明の精製ローヤルゼリーを配合してなる組成物は、精製ローヤルゼリーと無水糖質とを配合し、乾燥させることにより固状の形態とすることもでき、更に、粉末、顆粒、錠剤などとすることもできる。無水糖質としては例えば、無水 α 、 α -トレハロース、無水マルトース、無水環状四糖などが挙げられる。無水 α 、 α -トレハロースは特許第3168550号に開示されている方法で市販のトレハロース2含水結晶（株式会社林原商事販売、登録商標『トレハ』）から容易に調製でき、上記目的

に用いることができる。また、無水マルトースとしては市販の無水結晶マルトース（株式会社林原商事販売、登録商標『ファイントース』）が有利に利用できる。更に、無水環状四糖としては国際公開 WO 02/057011号に開示されている無水環状四糖を用いることが有利に実施できる。

本発明の精製ローヤルゼリーに無水糖質を配合してなる組成物は、例えば、精製ローヤルゼリーと無水糖質を混合し、必要に応じて他の成分を更に混合した後、該混合物を脱水乾燥するか、必要に応じて、更に、減圧乾燥、真空乾燥、加熱等の通常の乾燥工程に供することにより得ることができる。より具体的には、結晶又は非結晶の無水糖質を、精製ローヤルゼリーに、精製ローヤルゼリーとしての質量に対して、通常、4倍量以上、望ましくは、8倍量以上混合し、必要に応じて他の成分を更に混合した後、該混合物を、常温以下、望ましくは、30℃以下で、通常、4時間以上、望ましくは、8時間以上静置して、脱水乾燥すればよい。斯くして調製される固状の形態の当該精製ローヤルゼリーは、必要に応じて、更に乾燥工程を経た後、粉碎機、造粒機、打錠機などを用いて、粉末、顆粒、錠剤など所望の形態にしたり、さらに必要に応じて、例えば、該粉末又は該顆粒をカプセルに充填して利用することも有利に実施できる。

以上のような本発明の組成物に、更に、必要に応じて、市販の糖転移ビタミンC（別名L-アスコルビン酸2-グルコシド）を配合することもできる。L-アスコルビン酸が生体内でコラーゲンの産生を増強する作用を有することは良く知られているものの、L-アスコルビン酸は不安定で酸化分解を受け易いという欠点がある。一方、糖転移ビタミンCは化学的に安定な物

質であり、且つ、生体内ではじめて分解されてL-アスコルビン酸を遊離する。

また、本発明の組成物に、更に、必要に応じて、抗酸化剤を添加すると、精製ローヤルゼリーに含まれる有効成分の更なる安定化を達成することができる。したがって、当該組成物の適用対象や適用地域などに応じて、例えば、温度制御することなく船舶などで当該組成物を輸送したり、高温の地域で利用する場合などに有利に実施できる。本発明で用いる抗酸化剤は特定の種類に限定されないけれども、当該組成物を、ヒトを含む哺乳類のための食用として利用する場合には、食品分野で通常用いられるものから適宜選択するのが望ましい。食品分野で通常用いられる抗酸化剤としては、具体的には、フラボノイド、ポリフェノール、ビタミンE、ビタミンCなどが挙げられる。フラボノイドとしては、より詳細には、ルチン、ヘスペリジン、ナリンジン、ケルセチンや、それらのそれぞれにグルコース又はその重合体などの糖類が結合してなる、糖転移ルチン、糖転移ヘスペリジン、糖転移ナリンジン、糖転移ケルセチンなどが挙げられる。ポリフェノールとしては、より詳細には、カテキン、没食子酸などが挙げられる。さらに、植物抽出物である、エンジュ抽出物、ローズマリー抽出物、ユーカリ抽出物なども、本発明においては抗酸化剤として有利に利用できる。これらの抗酸化剤の当該組成物における含量は特に制限がないけれども、当該組成物を食用として用いる場合には、呈味への影響を考慮して、食品分野で通常用いられる配合割合にしたがうか、またはそれ以下で用いるのが望ましい。

本発明の組成物の望ましい食品の形態としては、例えば、ア

5 イスクリーム、アイスクャンデー、シャーベットなどの氷菓、
氷蜜などのシロップ、バタークリーム、カスタードクリーム、
フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペーストな
10 どのスプレッド及びペースト、チョコレート、ゼリー、キャン
ディー、グミゼリー、キャラメル、チューインガム、プリン、
シュークリーム、スポンジケーキなどの洋菓子、ジャム、マー
マレード、シロップ漬、糖菓などの加工果実ないしは加工野菜、
まんじゅう、ういろう、あん、羊羹、水羊羹、カステラ、飴玉
15 などの和菓子、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、マヨネーズ、
ドレッシング、食酢、三杯酢、テーブルシュガー、コーヒーシ
ュガーなどの調味料などが挙げられる。望ましい飲料の形態と
しては、例えば、合成酒、醸造酒、果実酒、洋酒などの酒類、
ジュース、ミネラル飲料、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料、
スポーツドリンク、ドリンク剤、茶、紅茶、ウーロン茶、コー
20 ヒー、ココアなどの清涼飲料などが挙げられる。

本発明の精製ローヤルゼリーはそのままで、又は、他の成分
を配合した組成物の形態で、例えば、家畜、家禽、ペット、そ
の他蜜蜂、蚕、昆虫、魚などの飼育動物のための飼料、餌料、
ペットフードなどとしても有利に利用できる。このような形態
25 を有する組成物に配合できる他の成分としては、それぞれの分
野で通常利用される、例えば、穀類、澱粉類、糟糖類、糖類、
油脂類、種実類、豆類、魚介類、肉類、卵類、乳類、植物蛋白
エキス、果実類、きのこ類、藻類、ビタミン類、ミネラル類、
アミノ酸類、その他として酵母、牧草、バガス、コーンコブ、
30 稲藁、干し草、油粕類、ふすま、大豆糟、各種発酵糟など、飼
料・餌料・ペットフード成分の１種又は２種以上が挙げられる。

組成物の形態としては、粉末、顆粒、錠剤、ペースト、グミなどの固状、又は乳液、ドリンク剤などの液状の形態で有利に利用できる。

本発明の組成物の望ましい化粧品形態としては、例えば、
5 ローション、乳液又はクリーム形態の、基礎化粧品、洗浄用化粧品、入浴用化粧品、頭髮化粧品、日焼け・日焼け止め化粧品、メイクアップ化粧品、発毛剤、育毛剤などが挙げられる。

以上のような形態の本発明による組成物を製造するには、目的とする製品を慣用の方法にしたがって製造する過程の適宜の
10 時期に本発明の精製ローヤルゼリーを添加すればよい。添加の時期に特に制限はないけれども、目的とする製品が加熱工程を経て製造されるものの場合には、加熱工程の後、常温、望ましくは、30℃以下に冷却した後に添加することにより、製造工程での有用な薬理作用の減衰を防ぐことができる。以上のような
15 本発明の組成物は、本発明の精製ローヤルゼリーを、製品質量あたり、通常、0.001%乃至20%、望ましくは、0.01%乃至10%含有する。

以上のような本発明による組成物は、アレルギー性が低減されている上、各種の有用な薬理作用が安定化されているので、
20 利用した生体において有用な薬理作用が効果的に発揮され、その生体の抵抗力の増強や、体調不良の改善の早期化、健康な状態の維持などが達成される。したがって、本発明の組成物は、健康を維持・増進するための食品、飲料、飼料、餌料、ペットフード、化粧品などとして極めて有用である。

25 以下、実験例に基づいて、より詳細に本発明を説明する。

<実験例 1 : ブラジル産及び中国産ローヤルゼリーの水分画とアレルギー性試験>

<実験例 1 - 1 : ブラジル産及び中国産ローヤルゼリーの水分画>

- 5 凍結保存していたブラジル産の生ローヤルゼリー(水分 62.5%) 及び中国産の生ローヤルゼリー(水分 65.7%) を常温で解凍し、12 g ずつを精秤し採取した。ローヤルゼリー質量の 4 倍量、すなわち 48 g の無菌の脱イオン水を上記ローヤルゼリーに加えて均一に攪拌し、一様に分散したのを確認した
- 10 後、5000 × g で 10 分間遠心分離し、それぞれから上清と沈殿を回収した。対照として、生ローヤルゼリー 12 g に脱イオン水を 48 g 加えて 60 g とし、上記と同様に攪拌し分散させたものを調製した。

<実験例 1 - 2 : アレルギー性試験>

- 15 実験例 1 - 1 で調製したブラジル産及び中国産ローヤルゼリーの上清と沈殿とについてアレルギー性を評価するにあたり、試料は全て生ローヤルゼリー相当量に合わせて用いた。生ローヤルゼリー相当量とは、試料の量をその原料である生ローヤルゼリーの質量に換算した量であり、上清、沈殿のいずれにおいても、その試料の量が本来の生ローヤルゼリーの質量 1 g に由来するものであればいずれも生ローヤルゼリー 1 g 相当量と表
- 20 される。アレルギー性試験はマウスでの抗原性試験を萩田らの方法(萩田忠厚、水島裕、「医学のあゆみ」、第 100 巻、814 頁、1977 年)に従って行った。すなわち、試験群当たり
- 25 各 5 匹の雌性 BALB/c マウス(9 週齢、日本チャールスリバー株式会社)に対し、一週間おきに 3 回、各標品を生ローヤ

ルゼリー相当量で 1. 5 m g / 匹、及びアジュバントとして水酸化アルミニウムゲル (A l u m) 2. 5 m g / 匹を腹腔内投与にて免疫した。3 回目の免疫から一週間後に各マウスの尾動脈より採血し、マイクロテナーを用いて血清を採取してラットを用いた P C A 法に供した。すなわち、正常 S D ラットの除毛した背中に、生理食塩水を用いて希釈 (1 0 0 倍又は 2 0 0 倍) したマウス血清を 0. 1 m l ずつ皮内注射し、2 4 時間経過後にマウスに投与した標品と同一の標品を生ローヤルゼリー相当量 7. 5 m g を 1 m l の 0. 5 % エバンスブルー色素溶液とともに静脈内投与して、血清投与部位に観察される青いスポットの大きさを測定した。平均直径 5 m m 以上のスポットを示すものを陽性と判断し、試験群 5 匹とも陽性であったものを 5 プラス (+ + + + +)、5 匹とも陰性であったものをマイナス (-) としてアレルゲン性の強さを評価した。ブラジル産ローヤルゼリーの上清と沈殿、及び対照についての試験結果を表 1 に、また、中国産ローヤルゼリーについて同様に表 2 に示す。

表 1

血清希釈倍数	アレルゲン性	
	100倍	200倍
対照(生RJ)	+++	-
上 清	+++++	++
沈 殿	+	-

RJ:ローヤルゼリー

表 2

血清希釈倍数	アレルギー性	
	100倍	200倍
対照(生RJ)	+++++	+++
上 清	+++++	+++++
沈 殿	++++	+

RJ:ローヤルゼリー

表 1 及び表 2 から明らかなように、比較的強いアレルギー性がブラジル産ローヤルゼリー、中国産ローヤルゼリーともに上清に認められ、沈殿のアレルギー性は比較的低い結果となった。水溶性の蛋白質が主なアレルギー性物質であると推察された。また、血清の希釈倍数 100 倍、200 倍の結果から中国産ローヤルゼリーの方がブラジル産ローヤルゼリーに比べてアレルギー性の強いことが判明した。

10

<実験例 2：水分画で回収される沈殿の全蛋白質量に対する水溶性蛋白質の割合とアレルギー性の低減に水分画回数が与える影響>

15 <実験例 2-1：回収される沈殿中の全蛋白質量に対する水溶性蛋白質の割合に水分画回数が与える影響>

水分画回数が回収される沈殿中の全蛋白質量に対する水溶性蛋白質の割合に与える影響を調べるために、ブラジル産の生ローヤルゼリー（水分 62.5%）12g を材料として用い、実験例 1-1 と同様にその質量の 4 倍量（48g）の水を加えて
20 5000×g で 10 分間遠心分離する水分画により上清と沈殿とに分離し、同様の操作をさらに 2 回繰返して沈殿を調製した。水分画を 1 乃至 3 回行って得たそれぞれの沈殿に含まれる水溶

性蛋白質の割合を算出するため、沈殿に上記水分画と同様に 4 倍量の水を加え、遠心分離して上清の蛋白質量と沈殿の蛋白質量をローリー法によりウシ血清アルブミンを標準蛋白質として定量し、上清に含まれる蛋白質量を水溶性蛋白質量とした。対

5 照として、実験例 1 - 1 と同様に、調製した生ローヤルゼリー懸濁液を遠心分離し、上記沈殿標品の場合と同様に蛋白質量を定量した。それぞれの水分画回数において回収される沈殿に含まれる全蛋白質と水溶性蛋白質の分析値と、これにより算出される全蛋白質量に対する水溶性蛋白質の割合を表 3 に示す。

10

表 3

水分画回数 (回)	上清蛋白質量 (mg)	沈殿蛋白質量 (mg)	全蛋白質量 (mg)	水溶性蛋白質 (%)
対照(生 R J 希釈液)	1092.0	567.0	1569.0	65.8
1	272.0	424.8	696.8	39.0
2	25.9	412.8	438.7	5.9
3	16.5	387.6	404.1	4.1

表 3 から明らかなように、生ローヤルゼリーの上記分析における全蛋白質量に対する水溶性蛋白（上清蛋白質量）の割合は 65.8% であるところ、水分画を 1 回行うことにより得られた沈殿のそれは約 40%、水分画を 2 回行うことにより得られた沈殿のそれは約 6% に低減していた。

<実験例 2 - 2：水分画により得られる沈殿とそのアレルギー性>

20

実験例 2 - 1 で得た水分画を 1 回、2 回、及び 3 回おこなった沈殿のアレルギー性を、希釈倍率を 50 倍と 100 倍とに変

えた以外は実験 1 - 2 と同様の方法を用いて評価した。対照として、実験例 1 - 1 と同様に調製した生ローヤルゼリー懸濁液を用いた。結果は表 4 に示す。

5 表 4

水分画回数(回)	アレルギー性	
	血清希釈倍数50倍	血清希釈倍数100倍
対照(RJ)	+++++	+++
1	++	+
2	+	-
3	-	-

上記結果より、水分画を 1 回行えば、沈殿の全蛋白質量に対する水溶性蛋白質の割合を約 40% 未満にまで低減でき、且つ、
10 アレルギー性を顕著に低減させ得ることが判明した。

<実験例 3：ローヤルゼリーからの各種分離品と精製ローヤルゼリーの調製>

中国産生ローヤルゼリー 60 g を原料とし、これに 4℃ の脱
15 イオン水を 240 g 加えて攪拌し、均一に分散させた。次いで、この懸濁液を遠心分離（5,000 × g、10 分間）し、上清と沈殿とに分離した。得られた沈殿に再度 4℃ の脱イオン水を 240 g 加えて同様に処理し、沈殿を得た。水分画一回めと 2
20 回めの上清をあわせて水分画上清液とし、ペンシル型の限外濾過膜（旭化成販売、商品名『AIP0013』、分画分子量 60,000 ダルトン）を用いた限外濾過に供した。少量の水にて水押しし、限外濾過液と限外濾過濃縮液とに分離した。限外濾過で

得られた濾液を最終的に沈殿に合わせて精製ローヤルゼリーとした。各操作段階の試料について蛋白質、糖質、及び有効成分の指標としてローヤルゼリー特有の成分であり、糖代謝や老化防止に関与するといわれている 10-ヒドロキシー-2-デセン酸の量を定量した。蛋白質はウシ血清アルブミンを標準蛋白質としてローリー法にて、また、糖質はグルコースを標準糖質としてアンスロン硫酸法にて定量した。10-ヒドロキシー-2-デセン酸は下記の条件による HPLC 法にて定量した。

(10-ヒドロキシー-2-デセン酸の HPLC 分析条件)

10 カラム：YMC-Pack AQ303-ODS ($\phi 4.6$ mm \times 250 mm、株式会社ワイエムシィ)、カラム温度：40℃、
検出器：UV 210 nm、移動相：50%メタノール（リン酸で pH を 2.2 に調整したもの）、流速：0.6 ml/分、サン
プル量：20 μ l、10-ヒドロキシー-2-デセン酸標準溶液
15 (20 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml) を用
いてあらかじめ作成した検量線により定量した。

各操作段階における各成分の回収率は、原料生ローヤルゼリー中に含まれる量を 100 としてそれぞれ算出した。結果を表 5 に示した。

20

表 5

標品 No.	分画品	液重量 (g)	蛋白質		10-HDA		糖質	
			(mg)	回収率(%)	(mg)	回収率(%)	(mg)	回収率(%)
1	生RJ	60	8280	100	1145	100	8580	100
2	沈殿	275	2305	28	275	24	165	2
3	上清	500	6605	80	800	70	8620	100
4	限外濾過液	600	195	2	660	58	7820	91
5	限外濾過濃縮液	250	5830	70	5	1	915	11
6	精製RJ	875	2500	30	935	82	7985	93

10-HDA: 10-ヒドロキシ-2-デセン酸

表 5 から明らかなように、生ローヤルゼリーに含まれる蛋白

質の大半の 6605 mg を占める水溶性蛋白質は水分画処理により上清に移行し、その内、5830 mg、すなわち 90% 近くが限外濾過濃縮液として除去できることが判明した。また、アレルギー性が比較的強い水溶性蛋白質と同時に上清に移行する原料生ローヤルゼリー中の糖質や 10-ヒドロキシ-2-デセン酸に代表される有用な低分子物質は、上清をさらに限外濾過に供して濾液としてこれを採取し、沈殿に合わせることで、それぞれ約 90% 以上及び 80% 以上の回収率で沈殿と限外濾過液とを合わせた本発明の精製ローヤルゼリーに回収できることが判明した。得られた精製ローヤルゼリーにおける遊離脂肪酸換算での 10-ヒドロキシ-2-デセン酸に対する全蛋白質の質量比は約 2.7 であり、約 7.2 の値を示す原料生ローヤルゼリーとは明瞭に異なっていた。

15 <実験例 4：ローヤルゼリー各種分離品と精製ローヤルゼリーのアレルギー性と有用な薬理作用>

実験例 3 で得たローヤルゼリー各種分離品と精製ローヤルゼリーのアレルギー性と、抗炎症作用の指標としての腫瘍壊死因子 TNF- α の産生抑制活性を調べた。

20 <実験例 4-1：腫瘍壊死因子 TNF- α の産生抑制活性測定>

4% チオグリコレート培地 1.5 ml を BALB/c マウスの腹腔内に注射し、3 日後に誘発された BALB/c マウス腹腔マクロファージを腹腔内より回収した。次いで、実験例 3-1 で得た各ローヤルゼリー分離品をもとの生ローヤルゼリー相当量で合わせて添加し、リポポリサッカライド (LPS) を終

濃度 $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、及びインターフェロン γ (IFN- γ) を
 終濃度 $10 \text{ IU} / \text{ml}$ 、及び、BALB/c マウス腹腔マクロ
 ファージを終濃度 5×10^5 個/ウェルになるように播きこん
 だ。培養 48 時間後に培養上清液を回収し TNF- α 産生量を
 5 固相酵素免疫測定法 (ELISA 法) にて測定した。ローヤル
 ゼリー各分離品の代わりにリン酸緩衝生理食塩水を用いて同様
 の操作を行ったものを対照 1 とし、また、生ローヤルゼリーを
 同濃度で同様の操作を行ったものを対照 2 として、対照 1 と対
 照 2 の TNF- α 活性の差を 100% として生ローヤルゼリー
 10 の TNF- α の産生抑制活性に対する相対的な TNF- α の産
 生抑制活性をパーセントで表した。また、各種ローヤルゼリー
 分離品及び精製ローヤルゼリーのアレルゲン性を実験例 1-2
 と同様に評価した。結果を表 6 に示す。

15 表 6

標品 No.	分画品	アレルゲン性 (血清200倍希釈)	TNF- α 相対 産生抑制活性(%)
1	生RJ	+++	100
2	沈 殿	+	0
3	上 清	+++++	100
4	限外濾過液	—	90
5	限外濾過濃縮液	+++++	10
6	精製RJ	+	90

表 6 から明らかなように、アレルゲン性を示す物質は水分画
 と膜分離により限外濾過濃縮液へと移行し、水分画の沈殿と限
 20 外濾過液を混合して調製した精製ローヤルゼリーでは原料の生
 ローヤルゼリーに対して、アレルゲン性が 1/3 に低減してい

た。また、ローヤルゼリーが本来有する抗炎症作用の指標となる腫瘍壊死因子 $\text{TNF-}\alpha$ の産生抑制活性を、原料の生ローヤルゼリーに対して、約 90 % が精製ローヤルゼリーに回収できていることが判明した。このように本発明の精製ローヤルゼリーはアレルギー性が低減し、且つ、ローヤルゼリーが本来有する有用な薬理作用が保持されたものであり、健康の維持、増進に有用であると判断される。

＜実験例 5：精製ローヤルゼリー及び生ローヤルゼリーに含まれる蛋白質のゲル等電点電気泳動法による比較＞

実験例 3 の方法で調製した精製ローヤルゼリーに含まれる蛋白質と原料の中国産生ローヤルゼリーに含まれる蛋白質とを比較する目的で両者をゲル等電点電気泳動に供した。まず、精製ローヤルゼリー及び生ローヤルゼリーそれぞれ 40 μg をテストチューブに採取し、真空乾燥した後、これに 100 μl の 8 M 尿素、4 % (w/v) CHAPS 及び 0.5 % (w/v) フアルマライト (Pharmalite、アマシャム・バイオテック社製) を含む等電点電気泳動用液に溶解し、さらに 150 μl の 8 M 尿素、4 % (w/v) CHAPS、50 mM ジチオスレイトール及び 1 % の IPG 緩衝液 (アマシャム・バイオテック社製) を加えて混合し泳動用試料とした。次いで、試料を専用の容器に入れ、これに等電点電気泳動用ゲル (商品名「Immobiline Dry Strip, pH 3-10」、13 cm、アマシャム・バイオテック社製) を浸し、室温で 16 時間かけて試料をしみ込ませてゲルを膨潤させた。このゲルを用い、電圧 100 V で 2 時間、300 V で 5 時間、3500 V で 12 時間

の条件で等電点電気泳動を行った。泳動終了後、ゲルを 0.025% (w/v) クーマシー・ブリリアント・ブルー (CBB) R-250、40% (v/v) メタノール及び 7% (v/v) 酢酸を含む染色液に 16 時間浸漬することによりゲル中の蛋白質を染色し、40% (v/v) メタノール及び 7% (v/v) 酢酸を含む脱色液中にて 30 分、次いで、5% (v/v) メタノール及び 7% (v/v) 酢酸を含む脱色液中で 5 時間、室温下で攪拌することにより脱色した。

精製ローヤルゼリー及び生ローヤルゼリーのいずれの試料に含まれる蛋白質もゲル等電点電気泳動により、等電点 5 を境とする大きく分けて 2 つの蛋白群に分離したことから、染色・脱色後のゲルをゲルスキャナー (商品名「DUAL-WAVELENGTH CHROMATO SCANNER CS-930」、島津製作所製) にかけて、等電点 5 未満を示す蛋白質と等電点 5 以上を示す蛋白質の割合 (%) を 600 nm の吸光度ピークの面積比を測定することにより比較した。精製ローヤルゼリー及び生ローヤルゼリーそれぞれ 4 検体で測定した平均の結果を表 7 に示した。

20 表 7

泳動試料	蛋白質量の割合 (%) *	
	等電点 5 未満	等電点 5 以上
精製ローヤルゼリー (本発明)	43.3	56.7
生ローヤルゼリー	58.3	41.7

*4 検体の平均値

表 7 の結果から明らかなように、通常の生ローヤルゼリーは

ゲル等電点電気泳動における等電点 5 以上を示す蛋白質が全蛋白質の約 42% であるのに対して、本発明の精製ローヤルゼリーのそれは約 57% を占めていた。このことから水分画処理によって低減させたアレルギー性の強い水溶性蛋白質中には、等電点 5 未満を示す蛋白質が比較的多く含まれることが推察される。本発明の精製ローヤルゼリーは、本明細書記載の 8 M 尿素存在下、pH 3 乃至 10 の範囲でのゲル等電点電気泳動において、等電点 5 未満を示す蛋白質に対する等電点 5 以上を示す蛋白質の量比が 1 以上であることが特徴といえる。

- 10 以下に、具体的な実施例をあげて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

実施例 A - 1

15 < 精製ローヤルゼリーの調製 >

- 生ローヤルゼリー（ブラジル産）10 kg に、4℃ の脱イオン水 40 kg を加えて攪拌し、均一に分散させた。次いで、この懸濁液を連続遠心分離機（株式会社久保田製作所製、モデル K T - 2000 G）を用いて、10,000 × g、流速 10 L / h r の条件で遠心分離し、上清と沈殿とに分離した。得られた上清を分画分子量 6,000 ダルトンの限外濾過膜（旭化成販売、商品名『A I P 2013』で濾過した。少量の脱イオン水にて水押しし、限外濾過液と限外濾過濃縮液とに分離した。この限外濾過液約 40 L を逆浸透膜（東洋紡販売、登録商標『ホ
- 20 ロセップ』）を用いて 50 kg f / c m² の圧力で約 5 kg まで濃縮した。得られた濃縮液と前記遠心分離の沈殿とを合わせ、
- 25

均一に攪拌し、精製ローヤルゼリーを調製した。本精製ローヤルゼリーにおいて、遊離脂肪酸換算での10-ヒドロキシ-2-デセン酸に対する全蛋白質の質量比は3.7であった。また、この精製ローヤルゼリーをゲル等電点電気泳動に供したところ、
5 等電点5未満を示す蛋白質に対する等電点5以上を示す蛋白質の量比は約1.3であった。

実施例 A - 2

<精製ローヤルゼリーの調製>

10 生ローヤルゼリー（中国産）20kgに、4℃の脱イオン水80kgを加えて攪拌し、均一に分散させた。次いで、この懸濁液を連続遠心分離機（株式会社久保田製作所製、モデルKT-2000G）を用いて、10,000×g、流速10L/hの条件で遠心分離し、上清と沈殿に分画した。得られた沈殿
15 に再度4℃の脱イオン水80kgを加えて同様に処理し沈殿を得た。水分画1回めと2回めの上清を合わせて水分画上清とし、これを分画分子量6,000ダルトンの限外濾過膜（旭化成販売、商品名『AIP2013』で濾過した。少量の脱イオン水にて水押しし、限外濾過液と限外濾過濃縮液とに分離した。こ
20 の限外濾過液約160Lを逆浸透膜（東洋紡販売、登録商標『ホロセップ』）を用いて50kgf/cm²の圧力で約12kgまで濃縮した。得られた濃縮液と前記遠心分離の沈殿とを合わせ、均一に攪拌し、精製ローヤルゼリーを調製した。本精製ローヤルゼリーにおける遊離脂肪酸換算での10-ヒドロキシ-2-
25 デセン酸に対する蛋白質の質量比は4.2であった。また、この精製ローヤルゼリーをゲル等電点電気泳動に供したところ、

等電点 5 未満を示す蛋白質に対する等電点 5 以上を示す蛋白質の量比は約 1 . 2 であった。

実施例 A - 3

5 <精製ローヤルゼリーの調製>

生ローヤルゼリー（中国産）5 質量部に、4℃の脱イオン水 20 質量部を加えて攪拌し、均一に分散させた。次いで、この懸濁液を連続遠心分離機（株式会社久保田製作所製、モデル K T - 2 0 0 0 G）を用いて、10,000×g、流速 10 L /
10 h r の条件で遠心分離し、上清と沈殿に分離した。得られた沈殿に再度 4℃の脱イオン水 20 質量部を加えて同様に処理し沈殿を得た。水分画 1 回めと 2 回めの上清を合わせて水分画上清とし、これをトヨパール H W - 4 0 F ゲル（株式会社東ソー販売）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーに供した。脱イオン
15 水にて溶出し、高分子画分と低分子画分とに分画した。この低分子画分を減圧エバポレーター（柴田科学株式会社製、R E - 1 0 E - 1 0 0 型）を用いて 40℃で 8 質量部まで濃縮した。得られた濃縮液と前記遠心分離の沈殿とを合わせ、均一に攪拌し、精製ローヤルゼリーを調製した。本精製ローヤルゼリーに
20 おける遊離脂肪酸換算での 10-ヒドロキシー-2-デセン酸に対する蛋白質の質量比は 4 . 9 であった。また、この精製ローヤルゼリーをゲル等電点電気泳動に供したところ、等電点 5 未満を示す蛋白質に対する等電点 5 以上を示す蛋白質の量比は約 1 . 2 5 であった。

< 無水 α , α -トレハロースの調製 >

市販の α , α -トレハロースの含水結晶（株式会社林原商事販売、登録商標『トレハ』）を、ジャケット付き回転式真空乾燥機を用いて、温度90℃、気圧-300乃至350mmHgの
5 条件で約7時間減圧乾燥した。その後、温度を常温に、気圧を常圧に戻して、製品を回収し、無水 α , α -トレハロースを得た。

実施例 B - 1

10 < 健康食品 >

参考例の方法で得た無水 α , α -トレハロースの5質量部と、実施例 A - 1 の方法で得た精製ローヤルゼリーの1質量部とを万能混合機（株式会社ダルトン製、モデルMDR-60）にて
15 15分間均一に混合した。この混合物を40℃で一夜真空乾燥した後、粉碎機（株式会社ダルトン製、商品名『パワーミルP-3』）を用いてスクリーン0.5mmで粉末にした。

当該粉末組成物を、打錠機を用いて1錠あたり約200mgの錠剤に成形した。本品は、簡便に利用できかつ著効を示す組成物である。本品は、まろやかな甘味と適度な酸味を示すので、
20 日常的に利用する健康食品として有用である。

実施例 B - 2

< 健康食品 >

以下の成分を以下の配合で均一に混合した後、実施例 B - 1
25 に準じて操作して、粉末形態の本発明の精製ローヤルゼリーを配合してなる組成物を調製した。調製後、実験1に準じて実験

を行い、当該組成物ではアレルギー性が低減していることを確認した。

参考例の方法で得た無水 α 、 α -トレハロース

5

8.5質量部

実施例A-2の方法で得た精製ローヤルゼリー

0.5質量部

糖転移ヘスペリジン（商品名『 α GヘスペリジンPS』、株式会社林原商事販売）

10

0.5質量部

ブルラン（商品名『ブルランPF-20』、株式会社林原商事販売）

0.5質量部

15

この精製ローヤルゼリー配合組成物を、打錠機を用いて1錠あたり約300mgの錠剤に成形した。本品は、アレルギー性が低減しており、簡便に利用できかつ著効を示す組成物である。本品は、まろやかな甘味と適度な酸味により良好な呈味を示すので、日常的に利用する健康食品として有用である。

20

実施例B-3

<健康食品>

25

以下の成分を以下の配合で均一に混合した後、実施例B-1に準じて操作して、粉末形態の本発明の精製ローヤルゼリー組成物を調製した。調製後、実験1に準じて実験を行い、当該組成物はアレルギー性が低減していることを確認した。

参考例の方法で得た無水 α ， α -トレハロース

7.5 質量部

実施例 A-3 の方法で得た精製ローヤルゼリー

5

1.0 質量部

マルチトール

1.3 質量部

レートリプトファン

0.2 質量部

10 本品は、アレルギー性が低減された、簡便に利用できかつ著効を示す精製ローヤルゼリー組成物である。本品は、まろやかな甘味と適度な酸味により良好な呈味を示すので、日常的に利用する健康食品として有用である。

実施例 B-4

15 <アイスクリーム>

生クリーム（油脂含量約 46 質量%）18 質量部、脱脂粉乳 7 質量部、全乳 51 質量部、砂糖 10 質量部、ラクトスクロース含有粉末（登録商標『乳化オリゴ』）4 質量部、プルラン 2 質量部、及びアラビアガム 2 質量部の混合物を溶解し、70℃で
20 30 分間保持して殺菌した後、ホモゲナイザーで乳化分散させ、次いで、3乃至4℃にまで急冷し、これに、実施例 A-2 の方法で得た精製ローヤルゼリー 4 質量部を加えてさらに混合し、一夜熟成した後、フリーザーで凍結させてアイスクリームを得た。

25 本品は、適度な甘味と上品な風味を示すとともに、健康の維持・増進に奏効するアイスクリームである。

実施例 B - 5

< 甘酒 >

- 白米 10 質量部を、常法に従って水を加えて炊き上げ、次いで、得られた飯米を冷却して 55℃ とし、常法により調製した麴 30 質量部と食塩 0.1 質量部を混合して 50 乃至 55℃ で 8 時間保ち、これをミキサーにかけ、さらに約 25℃ にまで冷却した時点で、実施例 A - 1 の方法で得た精製ローヤルゼリー 2 質量部を加えて混合した後、小包に充填し、甘酒を得た。
- 本品は、色調もよく、風味豊かな高品質の甘酒である上、健康の維持・増進のための飲料として有用である。

実施例 B - 6

< 健康飲料 >

- 無水結晶マルトース（林原商事販売、登録商標『ファイントース』）500 質量部、実施例 A - 1 の精製ローヤルゼリー 100 質量部、粉末卵黄 190 質量部、脱脂粉乳 200 質量部、糖転移ビタミン C（株式会社林原生物化学研究所販売、登録商標『AA2G』）2 質量部、塩化ナトリウム 4.4 質量部、塩化カリウム 1.85 質量部、硫酸マグネシウム 4 質量部、チアミン 0.01 質量部、アスコルビン酸ナトリウム 0.1 質量部、ビタミン E アセテート 0.6 質量部及びニコチン酸アミド 0.04 質量部からなる配合物を調製した。この配合物 25 質量部を精製水 150 質量部に均一に分散・溶解させ、150 g ずつ褐色ガラス瓶に封入した。

本品は、アレルギー性が低減されている上、栄養源が補足さ

れているので、健康維持、成長促進、病気の予防、治療の促進、スポーツ後の疲労回復促進などを目的とする健康飲料として有利に利用できる。なお、本品は、ヒトのみならず、家畜などの動物のための経口摂取又は経管投与用組成物としても有利に利用できる。

実施例 B - 7

< ペットフード（グミ） >

砂糖 30 質量部に水 8 質量部を加え加熱溶解し、これに水飴 50 質量部を加えブリックス糖度 85 乃至 90° に煮詰めた後、80℃ 以下まで冷却した。次いで、この糖液に、水 10 質量部の水にゼラチン 7 質量部を加熱溶解したものを加え、さらにビーフエキス 2 質量部、50 質量%クエン酸溶液 3 質量部、実施例 A - 1 の方法で得た精製ローヤルゼリー 1 質量部、香料を適量加えて均一に混合した。得られた配合物をスターチモールドに分注し、一晩放置してグミ状のペットフードを調製した。

本品は、アレルギー性が低減された精製ローヤルゼリーを配合している上、栄養源が補足されているので、ペットの健康維持、成長促進、病気の予防、治療の促進などを目的とするペットフードとして有利に利用できる。なお、本品は、イヌ、ネコのみならず、各種ペット及び家畜などの動物のための経口摂取用組成物としても有利に利用できる。

実施例 B - 8

< 皮膚外用クリーム >

以下の成分を、以下の配合にしたがって、常法により加熱し

つつ混合した。

モノステアリン酸ポリオキシエチレングリセリン

2. 0 質量部

5 自己乳化型モノステアリン酸グリセリン 5. 0 質量部

ベヘニン酸エイコサニル 1. 0 質量部

流動パラフィン 1. 9 質量部

トリオクタン酸トリメチロールプロパン 10. 0 質量部

10 上記の混合物に、精製ローヤルゼリーを除く以下の成分を以下の配合にしたがって添加・混合し、30℃以下にまで冷却した後に、さらに精製ローヤルゼリーを以下の配合で加え、ホモゲナイザーにより乳化して、皮膚外用クリームを製造した。

15 1, 3-ブチレングリコール 5. 0 質量部

乳酸ナトリウム液 10. 0 質量部

パラオキシ安息香酸メチル 0. 1 質量部

モモ葉エキス 1. 5 質量部

精製水 62. 2 質量部

20 実施例 A-3 の方法で得た精製ローヤルゼリー

1. 0 質量部

25 本クリームは、優れた保湿性を示す上、ローヤルゼリーのアレルギー性も低減されているので、アレルギー症状を引き起こす懸念なく、皮膚のみずみずしさを保つ基礎化粧品として有用である。

産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明は、全蛋白質量に対する水溶性蛋白質量の割合が50%未満に低減している精製ローヤルゼリーが、ヒトを含む哺乳類に対するアレルギー性が顕著に低減している上にローヤルゼリー本来の有用な薬理作用を保持しているという全く独自の知見に基づくものである。当該精製ローヤルゼリーは、重篤なアレルギー症状を引き起こす懸念がないので、ヒトを含む哺乳類が簡便かつ快適に、健康の維持・増進のために利用することができる。また、以上のような特長を有する本発明の精製ローヤルゼリーは、他の成分と配合することにより、食品、飲料、飼料、餌料、ペットフード、化粧品など各種組成物として利用することも有利に実施できる。

本発明は、斯くも顕著な作用効果を奏する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明である。

請 求 の 範 囲

1. 水溶性蛋白質が、全蛋白質量に対して50質量%未満に低減している精製ローヤルゼリー。
- 5 2. 精製ローヤルゼリーが、ローヤルゼリーが本来有する有用な薬理作用を実質的に失うことなくアレルギー性を除去したものである請求の範囲第1項記載の精製ローヤルゼリー。
3. 遊離脂肪酸換算での10-ヒドロキシ-2-デセン酸に対する全蛋白質の質量比が6未満である請求の範囲第1項又は第10 2項記載の精製ローヤルゼリー。
4. ローヤルゼリーに水を加えて遠心分離することにより沈殿と水溶性蛋白質を含む上清とに分離する工程、得られる上清を限外濾過又はゲル濾過することにより水溶性蛋白質を含む高分子物質を除去し低分子物質を採取する工程、及び得られた低分子物質を前記沈殿と混合する工程を組合わせることを特徴とする15 精製ローヤルゼリーの製造方法。
5. 請求の範囲第4項記載の製造方法によって得られる請求の範囲第1項乃至第3項のいずれかに記載の精製ローヤルゼリー。
6. 請求の範囲第1項乃至第3項又は第5項のいずれかに記載20 の精製ローヤルゼリーを配合してなる組成物。
7. 請求の範囲第1項乃至第3項又は第5項のいずれかに記載の精製ローヤルゼリーとともに無水糖質を配合して製造される組成物。
8. 無水糖質が、無水トレハロース、無水マルトース又は無水25 環状四糖のいずれかである請求の範囲第7項記載の組成物。

9. 糖転移ビタミンCをさらに配合してなる請求の範囲第6項乃至第8項のいずれかに記載の組成物。

10. 抗酸化剤の1種又は2種以上をさらに配合してなる請求の範囲第6項乃至第9項のいずれかに記載の組成物。

5 11. 抗酸化剤がフラボノイド、ポリフェノール、ビタミンE及びビタミンCである請求の範囲第10項に記載の組成物。

12. 飲食物、飼料、餌料、ペットフード又は化粧品としての請求の範囲第6項乃至第11項のいずれかに記載の組成物。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11311

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A23L1/076, A61K7/00, 7/48, A23K1/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A23L1/076, A61K7/00, 7/48, A23K1/16

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 4-311357 A (Api Kabushiki Kaisha), 04 November, 1992 (04.11.92), Full text; particularly, Claim 2; examples 1 to 6 (Family: none)	1-3, 5, 6, 9-12 4, 7, 8
X Y	JP 2001-61418 A (Pola Chemical Industries Inc.), 13 March, 2001 (13.03.01), Full text; particularly, Claims 1, 4; Par. Nos. [0008], [0009], [0011] (Family: none)	1-3, 5, 6, 9-12 4, 7, 8
Y	JP 2000-60455 A (Api Kabushiki Kaisha), 29 February, 2000 (29.02.00), Par. No. [0011] (Family: none)	4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
01 December, 2003 (01.12.03)

Date of mailing of the international search report
16 December, 2003 (16.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11311

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5543513 A (Kabushiki Kaisha Hayashibara; Seibutsu Kagaku Kenkyujo), 06 August, 1996 (06.08.96), Full text; particularly, column 6, line 58 to column 7, line 15 & EP 600730 A1 & AU 9352033 A & CA 2110331 A & CN 1094054 A & TW 308555 A & US 5693788 A & JP 6-170221 A	7,8
A	JP 2002-112715 A (Api Kabushiki Kaisha), 16 April, 2002 (16.04.02), Par. No. [0012] (Family: none)	1-12
A	JP 11-146759 A (Kirin Beverage Kabushiki Kaisha), 02 June, 1999 (02.06.99), Full text (Family: none)	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A23L 1/076, A61K 7/00, 7/48, A23K 1/16

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A23L 1/076, A61K 7/00, 7/48, A23K 1/16

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 4-311357 A (アピ株式会社) 1992. 11. 04 全文、特に、請求項 2, 実施例 1~6 (ファミリーなし)	1-3, 5, 6, 9-12 4, 7, 8
X Y	JP 2001-61418 A (ポーラ化成工業株式会社) 2001. 03. 13 全文、 特に、請求項 1, 4, 第 8, 9, 11 段落 (ファミリーなし)	1-3, 5, 6, 9-12 4, 7, 8
Y	JP 2000-60455 A (アピ株式会社) 2000. 02. 29 第 11 段落 (ファミリーなし)	4

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 12. 03

国際調査報告の発送日

16.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 淳子

(印)

4N

8115

電話番号 03-3581-1101 内線 3403

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	US 5543513 A (Kabushiki Kaisha Hayashibara;Seibutsu Kagaku Kenkyujo) 1996. 08. 06 全文、特に、第6欄第58行-第7欄第15行 & EP 600730 A1 & AU 9352033 A & CA 2110331 A & CN 1094054 A & TW 308555 A & US 5693788 A JP 6-170221 A	7, 8
A	JP 2002-112715 A (アビ株式会社) 2002. 04. 16 第12段落 (ファミリーなし)	1-12
A	JP 11-146759 A (麒麟ビバレッジ株式会社) 1999. 06. 02 全文 (ファミリーなし)	1-12